

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**Dünnschichtchromatographisch-enzymatische
Prüfung auf cholinesterasehemmende Insektizide
in der forensischen Toxikologie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Giok-Lien Ong
aus
Djakarta/Indonesien

1969

D 29

1971 889

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. H. Valentin
Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 11. 1969

Sonderdruck aus dem »Archiv für Kriminologie«

Bd. 146, 5. und 6. Heft, 1970

Verlag für polizeiliches Fachschrifttum Georg Schmidt-Römbild, Lübeck



Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Weinig)

Dünnschichtchromatographisch-enzymatische Prüfung auf cholinesterasehemmende Insektizide in der forensischen Toxikologie

Von

Prof. Dr. Dr. **Marika Geldmacher-v. Mallinckrodt**
und Dr. **Giok-Lien Ong**, Erlangen

(Mit 1 Abbildung und 1 Tabelle)

Die Anwendung von Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln hat ein großes Ausmaß erreicht. Für die forensische Toxikologie haben die Alkylphosphate besondere Bedeutung, da sie zum großen Teil hoch toxisch sind und leicht in Laienhände gelangen. Alle Alkylphosphate hemmen mehr oder weniger stark und lang die Cholinesterasen. Dies kann klinisch zur Sicherung der Diagnose dienen. Carbamate haben eine ähnliche, im allgemeinen schwächere Wirkung. Auch hier sind Todesfälle bekanntgeworden. Da der Hauptangriffspunkt der Alkylphosphate und Carbamate die Cholinesterasen sind, kann deren Blockierung in vivo zum Nachweis einer Vergiftung, in vitro zur Prüfung auf diese Verbindungsgruppen herangezogen werden.

Zu beachten ist, daß manche Alkylphosphate in vitro nur schwache Cholinesterasehemmer sind. Wenn sie in Rückständen oder Extrakten nachgewiesen werden sollen, müssen sie vorher oxydiert werden, wodurch die Nachweisempfindlichkeit zum Teil um mehrere Zehnerpotenzen gesteigert wird. Bei in vitro-Versuchen muß außerdem daran gedacht werden, daß neben den beiden genannten Verbindungsgruppen z. B. auch konzentrierte Pflanzenextrakte allein eine merkliche Hemmung auf die Cholinesterasen ausüben können.

Deshalb kombinierten manche Autoren die Methode mit der Papierchromatographie. Während für die enzymatische Detektion nach papierchromatographischer Auftrennung zum Teil recht umständliche Verfah-

ren beschrieben worden sind (z. B. COOK 1955), und auch die ersten dünn-schichtchromatographischen Verfahren die Detektion nach Abklatschen der entwickelten Dünnschichtplatte auf ein feuchtes Filtrierpapier vornahmen (Bunyan 1964), haben schon Winterlin, Walker und Frank (1968) die enzymatische Detektion direkt auf der entwickelten Dünnschichtplatte vorgenommen.

Heyndrickx, Vercruysse und Noe (1967) haben gleichfalls nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung (Hexan-Aceton 4:1) die durch organische Phosphorinsektizide verursachte Cholinesterasehemmung für deren Nachweis verwendet. Zur Oxydation der Insektizide gebrauchten sie gesättigten Bromdampf, der 15 Minuten einwirkte. Das überschüssige Brom wurde mit einem Fön entfernt. Als Enzymlösung diente Pferdeplasma, als Substrat α -Naphthylacetat. Heyndrickx und Mitarbeiter sind die ersten, die die enzymatische Detektion von Organophosphaten nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung auf forensisches Material, nämlich Magen-Darminhalt sowie Organe nach E 605-Vergiftung, angewandt haben. Sie stellten aus den genannten Proben Extrakte her, von denen nach einigen Reinigungsschritten Anteile dünn-schichtchromatographisch-enzymatisch untersucht wurden.

In der Praxis haben sich bei den verschiedenen geschilderten Verfahren grundsätzlich zwei Schwierigkeiten ergeben:

1. Die die Nachweisempfindlichkeit steigernde Oxydation der Organophosphate zu den wirksamen Hemmstoffen, meist durch Anwendung von Bromdampf, ist schwierig zu standardisieren. Die Zeit der Exposition, die Temperatur der Dünnschichtplattenoberfläche, die Konzentration des Broms im Dampfraum sowie der Abstand der Platte von der Bromlösung sind von entscheidender Bedeutung. (Vergl. z. B. Winterlin, Walker und Frank 1968; Ackermann 1968.)
2. Die von den einzelnen Autoren angegebenen Enzymquellen, z. B. menschliches Serum, Pferdeserum, Bienenkopf-Cholinesterase, sind nicht überall jederzeit und einfach verfügbar.

Ackermann (1968) hat bei der enzymatischen Detektion von cholinesterasehemmenden Insektiziden auf der Dünnschichtplatte (Rein-substanzen) für die Oxydation ein Besprühen mit gesättigter wässriger Bromlösung vorgeschlagen. Dieses Verfahren ist der bisher üblichen Behandlung mit Bromdampf überlegen. Bei E 605, Methyl-E 605 und Bromophos ist z. B. im Vergleich zur Bromdampfbehandlung eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit um etwa zwei Zehnerpotenzen zu erzielen. Durch anschließendes Aufsprühen von Natriumthiosulfatlösung zur Entfernung des Bromüberschusses statt der bisher meist üblichen Erwärmung z. B. durch Verwendung eines Föns war für DDVP und Dibrom wie auch alle anderen direkt hemmenden Ver-

bindungen keine Empfindlichkeitseinbuße nachzuweisen. Als Enzymquelle verwendet A c k e r m a n n ein Rinderleberhomogenat.

Viele an Reinsubstanzen ausgearbeitete analytische Verfahren sind in der forensischen Toxikologie nicht ohne weiteres anwendbar. Es muß in jedem Falle geprüft werden, ob eine Methode, die mit reinen Wirkstoffen oder z. T. auch für die Rückstandsbestimmung von Insektiziden in pflanzlichem Material entwickelt wurde, für das in forensischen Fällen anfallende Material, wie z. B. Mageninhalt, vergiftete Speisen und Getränke, Giftreste in Gefäßen usw., brauchbar ist. Es erschien uns deshalb interessant, die Anwendbarkeit der empfindlichen dünnstichtchromatographisch-enzymatischen Prüfung auf Cholinesterase-Hemmstoffe nach A c k e r m a n n (1968) in der forensisch-toxikologischen Praxis zu untersuchen.

Arbeitsvorschrift

1. Material und Reagenzien

Dünnstichtplatten: Kiesel-GeO-Fertig-Platten D 254/366 der Fa. Woelm

Fließmittel: Hexan-Aceton 4 : 1 nach B ä u m l e r und R i p p s t e i n

Bromwasser: frisch bereitete, gesättigte, wäßrige Lösung

Natriumthiosulfatlösung: 0,1 n, wäßrig

Enzymlösung: 1 Teil Rinderleber wird mit 9 Teilen dest. Wasser in einem Mixer zerkleinert und zur Abtrennung der festen Bestandteile 10 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Der enzymhaltige Überstand wird nochmals 1 : 4 mit dest. Wasser verdünnt. Die Leber und auch das zentrifugierte Homogenat sind in tiefgefrorenem Zustand mehrere Monate ohne wesentliche Aktivitätsverluste haltbar.

Substratlösung: 4 ml einer äthanolischen β -Naphthylacetat-Stammlösung mit 125 mg β -Naphthylacetat (naphtholfrei) in 100 ml absolutem Athanol werden mit 16 ml einer frisch bereiteten wäßrigen Diazoniumsalzlösung (ca. 20 mg bisdiazotiertes o-Dianisidin, „Echtblausalz B“, „Fast Blue Salt B“ in 16 ml dest. Wasser) vermischt. Die Substratlösung muß jeweils unmittelbar vor dem Besprühen hergestellt werden.

2. Durchführung des enzymatischen Hemmtestes

Nach der dünnstichtchromatographischen Auftrennung und dem Abdunsten der organischen Lösungsmittel werden die Platten mit der frisch bereiteten Bromlösung gleichmäßig besprüht. Nach einer Einwirkungsdauer von 15 Min. bei Zimmertemperatur wird das überschüssige Brom durch leichtes Besprühen mit der 0,1 m Natriumthiosulfatlösung beseitigt. Danach wird mit Enzymlösung besprüht.

Zur Durchführung der Cholinesterase-Hemmreaktion werden die Platten anschließend 60 Min. in einer feuchten Kammer inkubiert. A c k e r m a n n verwendet hierfür einen feuchtigkeitsgesättigten Brutschrank bei einer Temperatur von 38° C. Auch ein hinreichend großes Glasgefäß, das innen mit einem mit heißem Wasser befeuchteten Filtrierpapier ausgelegt ist, eignet sich.

Anschließend wird nach oberflächlichem Antrocknen der Schicht die Substratlösung aufgesprüht. Nach einigen Minuten färben sich die Platten durch die enzymatische Substratspaltung und Kupplung des dabei entstehenden β -Naphthols mit dem Diazoniumsalz rosa bis rot. Die Cholinesterase-Hemmstoffe sind infolge Ausbleibens der Substratspaltung durch weiße Flecken zu erkennen.

Zur Erzielung einer maximalen Nachweisempfindlichkeit muß eine Überdosierung des Enzympräparates, angezeigt durch eine sehr rasche und intensiv blaurote Färbung der Platte, vermieden werden, da zu hohe Enzymkonzentrationen bei sehr kleinen Inhibitormengen nur zu einer teilweisen Enzymhemmung und damit zu einem Ablauf der enzymatischen Substratspaltung auch an dem Ort der Inhibitoren führen können.

Für gutes Gelingen des Testes ist es erforderlich, vor jedem neuen Besprühen die Platte mit einem kalten Fön zu trocknen.

3. Nachweisgrenzen

Nach dem angegebenen Verfahren haben wir die Nachweisgrenzen und Rf-Werte der folgenden in die Untersuchung einbezogenen Substanzen

Trivialname	Chemische Bezeichnung
E 605	0,0-Diäthyl-0-p-nitrophenyl-thiophosphorsäure
Metasystox-R	0,0-Dimethyl-S-2-(äthylsulfinyl)-äthylthiophosphorsäure
Systox	0,0-Diäthyl-0-2-(äthylmercapto)-äthylthiono-phosphor-säure
Lebaycid	0,0-Dimethyl-0-(4-methyl-mercapto-3-methylphenyl)-thionophosphorsäure
Unden	2-Isopropoxyphenyl-N-methylcarbamat

an Verdünnungen von Handelspräparaten festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 festgehalten.

Tabelle 1: Nachweisgrenze und Rf-Werte der Wirkstoffe aus Handelspräparaten; Kieselgel D 254/366 Fertigplatten Woelm; Fließmittel: n-Hexan-Aceton 4 : 1; Detektion nach Ackermann (1968)

Trivial-Name	Rf-Wert	Nachweisgrenze
E 605	0,67	20 ng
Metasystox-R	0,36	2 γ
Systox	0,20	2 γ
Lebaycid*)	0,45	2 γ
Unden	0,25	4 γ

*) Da Lebaycid ein schwächerer Cholinesterase-Hemmer als die anderen geprüften Verbindungen ist, wurde, um eine deutliche Cholinesterase-Hemmwirkung zu erzielen, die Enzymlösung statt 1 : 4 im Verhältnis 1 : 8 mit dest. Wasser verdünnt.

Die Nachweisgrenzen liegen naturgemäß höher als die von Ackermann (1968) für Reinsubstanzen (95—100%) ermittelten. Sie erscheinen aber für forensische Zwecke als durchaus ausreichend, und liegen durchweg noch günstiger als die von Heyndrickx und Mitarbeiter (1967) angegebenen Werte (100 ng E 605, 1 γ Systox, 25 γ Lebaycid).

Prüfung der Methode an forensischen Fällen

Die Prüfung erfolgte an insgesamt 9 forensischen Fällen. Für jeden Fall werden mitgeteilt:

- a) Vorgeschichte
- b) Ergebnis der dünn-schichtchromatographisch-enzymatischen Prüfung nach A c k e r m a n n (1968).
- c) Andere durchgeführte Untersuchungen zur Sicherung des Alkylphosphat- bzw. Carbamatnachweises.

I. E 605

1. Fall:

- a) M. erstattete Anzeige, weil ihm mehrere kleine Likörfaschen übersandt worden waren. Er hatte Verdacht geschöpft, weil die Umhüllungen der Flaschen aufgerissen waren, und auf diesen bläuliche Flecken zu erkennen waren.
- b) Der Inhalt der Flaschen wurde mit Aceton im Verhältnis 1 : 2000 verdünnt. Hiervon wurden 0,02 ml nach A c k e r m a n n dünn-schichtchromatographisch untersucht. Es wurde eine Fraktion mit dem Rf-Wert von Äthyl-E 605 gefunden. Die Nachweisgrenze lag unter Zugrundelegung der unter c) aufgeführten quantitativen E 605-Bestimmung bei etwa 20 ng.
- c) In allen Flaschen war durch den positiven Ausfall des biologischen Tests mit *Drosophila melanogaster*, die Alkalikochprobe (Kaiser und Haag 1956) mit anschließender Indophenolblaureaktion nach v. Eicken (1954), den dünn-schichtchromatographischen E 605-Nachweis nach Bäumler und Rippstein sowie spektrophotometrisch nach G. Schmidt E 605 nachweisbar. Nach Fischer und Klingelhöller waren die beiden Spaltstücke des Äthyl-E 605, Diäthylthiophosphorsäure und p-Nitrophenol, in allen Proben zu finden. Die quantitative E-605-Bestimmung nach Kaiser und Haag ergab in den einzelnen Fläschchen in je 20 ml eine E 605-Menge zwischen 0,7—1,9 g.

In allen Flaschen war außerdem spektrophotometrisch der den E 605 forte-Präparaten beigemischte blaue Warnfarbstoff nachweisbar, ebenso papierchromatographisch und spektrophotometrisch der entsprechende Emulgator.

2. Fall:

- a) Frau K. übergab uns ein Originalfläschchen „Pandigal“ Herztropfen, das etwa 2 ml einer leicht getrübbten Flüssigkeit enthielt. Sie berichtete, daß sie einige Tage zuvor aus der Flasche wie üblich habe einnehmen wollen. Dabei sei ihr eine Trübung aufgefallen. Die auf einen Löffel gebrachten Tropfen hätten einen eigenartigen Geruch und Geschmack besessen..
- b) Die Flüssigkeit in der Pandigal-Flasche wurde im Verhältnis 1 : 500 mit Aceton verdünnt. Hiervon wurden 0,02 ml nach A c k e r m a n n ((1968) untersucht. Es wurde eine Fraktion mit dem Rf-Wert von Äthyl-E 605 gefunden. Die Nachweisgrenze lag unter Zugrundelegung der unter c) angegebenen quantitativen Bestimmung bei etwa 2 γ.
- c) Im Flascheninhalt war durch den biologischen Test sowie spektrophotometrisch nach G. Schmidt E 605 nachweisbar. Nach Fischer und Klingelhöller konnten Diäthylthiophosphorsäure und p-Nitrophenol gefunden werden. Papierchromatographisch und spektrophotometrisch war der handelsüblichen E 605-Präparaten beigemischte Emulgator nachweisbar, nicht jedoch der blaue Warnfarbstoff. Die quantitative Bestimmung erfolgte nach Kaiser und Haag. Sie ergab eine E 605-Menge von 60 mg in 2 ml Flascheninhalt.

3. Fall:

- a) Vermuteter Suicid. Neben der Leiche lag ein Wasserglas mit wenig blaugefärbter Flüssigkeit.

- b) Die blaue Flüssigkeit auf dem Trinkglasboden wurde im Verhältnis 1 : 5000 mit Aceton verdünnt. Hiervon wurden 0,02 ml nach Ackermann (1968) untersucht. Es fand sich eine Fraktion mit dem Rf-Wert von E-605. Die Nachweisgrenze lag (vergleiche c) bei etwa 20 ng.
- c) Im blaugefärbten Rückstand in dem Trinkglas war Äthyl-E 605 in Form von E 605 forte mit den bereits genannten Methoden nachweisbar.

4. Fall:

- a) Suicid vermutlich mit E 605 forte bei einer 42jährigen Hausfrau.
- b) Zur Untersuchung erhielten wir lediglich Magenspülflüssigkeit. Diese wurde mit Aceton im Verhältnis 1 : 50 verdünnt. 0,02 ml hiervon ergab nach Ackermann eine Fraktion mit dem Rf-Wert von E 605. Die Menge, geschätzt aus der Fleckengröße, entsprach etwa 200 ng.
- c) Mit den bereits genannten Methoden war in der Spülflüssigkeit Äthyl-E 605 nachweisbar.

5. Fall:

- a) K. wurde tot aufgefunden. Wegen Verdachts auf eine Vergiftung mit E 605 wurde uns überbracht
 - α) ein kleines Trinkglas, das noch einige ml einer tiefblau gefärbten aromatisch riechenden Flüssigkeit enthielt,
 - β) ein Mulltupfer, mit dem wenig blaue Flüssigkeit aus dem Mund des K. gesichert worden war,
 - γ) Leichenblut,
 - δ) eine Unterhose, mit der die Leiche bekleidet gewesen war.
- b) α) Trinkglas mit blauer Flüssigkeit
In 0,02 ml einer Verdünnung 1 : 5000 mit Aceton konnte E 605 nach Ackermann (1968) nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze lag etwa bei (vergleichbare c) 20 ng.
 - β) Mulltupfer
 $\frac{1}{3}$ des Mulltupfers wurde mit 1 ml Aceton ausgewaschen und von der Acetonlösung eine Verdünnung 1 : 100 mit Aceton hergestellt. Hiervon wurden 0,02 ml nach Ackermann untersucht. Es zeigte sich eine Fraktion etwa von der gleichen Größe wie bei Auftragen von 100 ng E 605 und gleichem Rf-Wert.
- c) α) Trinkglas mit blauer Flüssigkeit
Nach dem Ergebnis der Untersuchungen mit den bereits genannten Verfahren enthielt das Trinkglas unverdünntes E 605 forte.
 - β) Mulltupfer
Der biologische Test auf Insektizide fiel mit $\frac{1}{3}$ des Mulltupfers positiv aus. Sodann wurde dieser Teil des Tupfers mit 2 n Natronlauge erhitzt, die entstandene gelbgefärbte Lösung mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. In der Ätherphase waren nach Fischer und Klingelhöller p-Nitrophenol und Diäthylthiophosphorsäure dünn-schichtchromatographisch nachweisbar.
 - γ) Leichenblut
Die Bestimmung der Cholinesteraseaktivität im Serum nach Friedberg und Sakai ergab eine niedrige Aktivität von 46 μ l CO₂/60 Minuten, die durch Zusatz von PAM auf 98 μ l CO₂/60 Minuten reaktivierbar war.
 - δ) Unterhose
In der eingeeigten Waschflüssigkeit aus dem verschmutzten Schrittbereich der Unterhose konnte eine positive Reaktion nach v. Eicken erhalten werden, wie ihn auch p-nitrophenolhaltiger Urin ergibt.

Abbildung 1 gibt das Untersuchungsergebnis bei einigen der aufgeführten Fälle wieder.

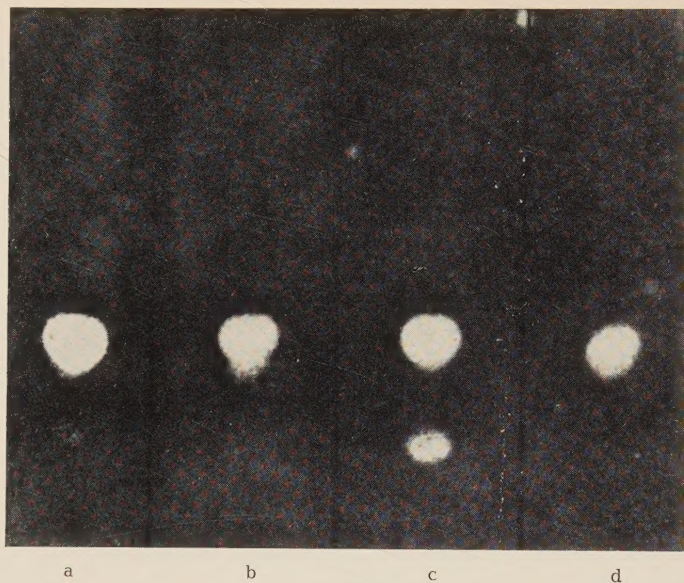


Abb. 1

Dünnschichtchromatographische Prüfung auf E 605 in forensischen Fällen. Detektion über die Cholinesterase-Hemmung nach Ackermann (1968)

- a) Test: 0,2 γ E 605
- b) 1. E 605-Fall; 1 : 2000 verdünnter Flascheninhalt 2
- c) 2. E 605-Fall 1 : 500 verdünnter Flascheninhalt
- d) 5. E 605-Fall; verdünnter Extrakt aus Multtupfer

II. Systox

- a) Eine 55 Jahre alte Bäuerin war tot aufgefunden worden. Da die Angehörigen den Tod mit einer wenige Tage zuvor durch einen Hufschlag erfolgten Verletzung in der Leistengegend in Zusammenhang brachten, wurde eine Sektion durchgeführt. Wir erhielten Mageninhalt zur Untersuchung.
- b) Ca. 1 g des dickbreiigen Mageninhalts wurde mit 5 ml Aceton durchgeschüttelt und zentrifugiert. Von der überstehenden Lösung wurden nach Verdünnung mit Aceton im Verhältnis 1 : 500 0,02 ml nach Ackermann untersucht. Hierbei war deutlich eine Fraktion mit dem Rf-Wert von Systox nachweisbar.
- c) Mit dem Mageninhalt fiel der biologische Test stark positiv aus. Nach Fischer und Klingelhöller war dünnschichtchromatographisch Diäthylthiophosphorsäure nachweisbar, jedoch nicht p-Nitrophenol. In dem Ätherextrakt aus einem Wasserdampfdestillat von Mageninhalt wurde nach Bäumler und Rippstein dünnschichtchromatographisch eine Fraktion mit dem Rf-Wert von Systox gefunden. Die Anwesenheit von Systox wurde weiter nach Geldmacher-v. Mallinckrodt und Weigel gesichert.

III. Metasystox R

- a) Bei dem tot aufgefundenen St. hatte die Kriminalpolizei Verdacht auf eine Schädlingsbekämpfungsmittelvergiftung, da zahlreiche blaue Verfärbungen an Körper und Mund vorhanden waren. Zur Untersuchung war uns grünlige Magenspülflüssigkeit übersandt worden.
- b) Diese wurde 1:10 mit Aceton verdünnt und 0,02 ml hiervon nach Ackermann untersucht. Es zeigte sich eine Fraktion mit dem Rf-Wert von Metasystox R; die Menge entsprach etwa 20 γ .
- c) Mit 0,1 ml der Spülflüssigkeit fiel der biologische Test auf Insektizide stark positiv aus. Nach Fischer und Klingelhöller konnte dünn-schichtchromatographisch Dimethylthiophosphorsäure nachgewiesen werden, nach Bäumler und Rippstein dünn-schichtchromatographisch eine Fraktion mit dem Rf-Wert von Metasystox R.

IV. Lebaycid

- a) Ein 24jähriger Mann hatte nach einer häuslichen Auseinandersetzung etwa eine halbe Flasche Cognac und ein Originalfläschchen (30 ml) Lebaycid getrunken. Klinikaufnahme mit den Symptomen einer Alkylphosphatintoxikation. Wir erhielten Blut, Magenspülflüssigkeit und Harn zur Untersuchung.
- b) In diesem Falle wurden 0,2 ml Spülflüssigkeit direkt neben 100 γ Lebaycid auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Da Lebaycid keine so starke Cholinesterasehemmung zeigt wie die anderen untersuchten Verbindungen, wurde die Enzymlösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:8 statt wie üblich 1:4 verdünnt. Nach Detektion zeigte sich eine Fraktion mit dem Rf-Wert von Lebaycid.
- c) Im Mageninhalt war durch den biologischen Test, die dünn-schichtchromatographische Erfassung des ungespaltenen Wirkstoffs nach Bäumler und Rippstein im Ätherextrakt sowie das Auffinden des aromatischen Spaltstückes von Lebaycid nach alkalischer Hydrolyse, 3-Methyl-4-Methylmercaptophenol (dünn-schichtchromatographisch und spektrophotometrisch) Lebaycid nachweisbar. Im Harn war 3-Methyl-4-Methylmercaptophenol in einer Menge von etwa 40 γ % dünn-schichtchromatographisch, papierchromatographisch sowie spektrophotometrisch aufzufinden. Die Cholinesteraseaktivität im Serum, gemessen nach Friedberg und Sakai, betrug praktisch Null (vgl. v. Clarmann und Geldmacher-v. Mallinckrodt).

V. Unden

- a) W. wurde nach einem häuslichen Streit tot aufgefunden. Wir untersuchten Mageninhalt.
- b) 1 g des dicken bräunlichen Mageninhaltes wurde mit 5 ml Aceton durchgeschüttelt und zentrifugiert. Von der überstehenden Lösung wurden 0,02 ml nach Ackermann untersucht. Nach Detektion zeigte sich ein Fleck mit dem Rf-Wert des Unden, die Größe entsprach etwa 20 γ .
- c) Im Mageninhalt konnte Unden papierchromatographisch, UV-spektrophotometrisch und IR-spektrophotometrisch nachgewiesen werden. Andere Gifte wurden in Körperflüssigkeiten und Organen nicht gefunden.

Diskussion

Die Prüfung von biologischem Material auf Alkylphosphate und insektizide Carbamate über die Cholinesterase-Hemmwirkung stellt ein sehr spezifisches und zugleich sehr empfindliches Verfahren dar. Während die Feststellung der Cholinesterase-Hemmwirkung allein nur als Gruppentest angesehen werden kann, erlaubt das Vorschalten eines chroma-

topographischen Auftrennungsschritten bereits eine gewisse Unterscheidung zwischen den einzelnen Angehörigen der Gruppe über den Rf-Wert, u. U. in verschiedenen Laufmittelsystemen.

Die Methode von Ackermann (1968) zum Nachweis von Alkylphosphaten und insektiziden Carbamaten nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung und Oxydation mit wäßriger Bromlösung über die Hemmung von Rinderleber-Cholinesterase (Substrat β -Naphthylacetat) ist ein einfach und schnell arbeitendes sehr empfindliches Verfahren, das sich uns in der forensisch-analytischen Praxis, insbesondere bei der Prüfung auf E 605, Systox, Metasystox R, Lebaycid und Unden in Mageninhalt und -spülflüssigkeit, Speichel, Getränken, Medikamenten und Rückständen in Trinkgefäßen, bewährte.

Bei Prüfung des Verfahrens an forensischem Material zeigte sich, daß eine Anreicherung durch Extraktion bei Untersuchung von Mageninhalt, Darminhalt und Asservaten aufgrund der großen Empfindlichkeit meist nicht erforderlich ist. Es genügte vielmehr in den untersuchten Fällen, mit Aceton mehr oder weniger stark zu verdünnen, u. U. zu zentrifugieren, und die Acetonlösung direkt auf die Dünnschichtplatte aufzutragen.

Das Vorgehen von Ackermann erwies sich in vergleichenden Untersuchungen im allgemeinen als noch empfindlicher als der biologische Test z. B. mit *Drosophila melanogaster* (Geldmacher-v. Mallinckrodt 1967), der an Empfindlichkeit viele chemischen Verfahren zum Nachweis von Organophosphaten und insektiziden Carbamaten übertrifft, und stellt so eine wertvolle Ergänzung und Bereicherung für die Analytik dieser Stoffgruppe dar.

Dabei ist das Verfahren einfach durchzuführen und gut reproduzierbar. Wird die Fermentlösung vorrätig gehalten, so beansprucht die gesamte Untersuchung etwa 2½ Stunden. Die erzielte Anfärbung ist über viele Tage stabil und leicht photographisch festzuhalten. Die Verwendbarkeit von Fertigplatten ermöglicht die Anwendung auch in kleinen Laboratorien.

Wir danken Herrn Dr. D. Lorke, Leiter des Instituts für Toxikologie der Farbenfabriken Bayer AG, für die Überlassung einiger Originalpräparate.

Zusammenfassung

Die dünnsschichtchromatographisch-enzymatische Prüfung auf cholinesterasehemmende Insektizide (Alkylphosphate, Carbamate) nach Ackermann ist insbesondere bei Verwendung von Fertigplatten ein einfaches, empfindliches Verfahren, das meist keine vorherigen Extraktions- und Reinigungsschritte erfordert. Es hat sich uns bei der Untersuchung von Mageninhalt und Asservaten im Zusammenhang mit Vergiftungen durch E 605, Metasystox R, Systox, Lebaycid und Unden in der forensisch-toxikologischen Praxis sehr bewährt.

Literatur

- Ackermann, H.: Dünnschichtchromatographisch-enzymatischer Nachweis phosphororganischer Insektizide. Aktivierung schwacher Esterasehemmer. J. Chromatog. **36**, 309 (1968).
- Bäumler, J., und S. Rippstein: Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Insektiziden. Helv. Chim. Acta **44**, 1162 (1961).
- Bunyan, P. I.: The detection of organo-phosphorus pesticides on thin-layer chromatograms. Analyst **89**, 615 (1964).
- v. Clarmann, M., und M. Geldmacher-v. Mallinckrodt: Über eine erfolgreich behandelte akute orale Vergiftung durch Fenthion und seinen Nachweis im Mageninhalt und Harn. Arch. Toxikol. **22**, 2 (1965).
- Cook, J. W.: Paper chromatography of some organic phosphate insecticides, IV. Assoc. Offic. Agr. Chem. **38**, 150 (1955).
- v. Eicken, S.: Zur Ausscheidung von p-Nitrophenol im Urin nach Einwirkung von Pflanzenschutzmittel „E 605“. Angew. Chem. **66**, 551 (1954).
- Fischer, R., und W. Klingelhöller: Der Nachweis und die quantitative Bestimmung von Thiophosphorsäureestern in biologischem Material. Arch. Toxikol. **19**, 119 (1961).
- Friedberg, K. D., und F. Sakai: Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentaktivierenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methjodid, PAM). Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. **47**, 580 (1958).
- Geldmacher-v. Mallinckrodt, M.: Der forensische Nachweis von Insektiziden der Systoxgruppe. Schmidt-Römhild, Lübeck 1957.
- Geldmacher-v. Mallinckrodt, M., und U. Weigel: Nachweis von Systox und Metasystox durch Schwermetallkomplexverbindungen. Arch. Toxikol. **20**, 114 (1963).
- Heyndrickx, A., A. Vercruysse and M. Noe: A review of fourty one cases of parathion (E 605) poisoning by man. J. Pharm. Belg. 127 (1967).
- Kaiser, H., und Th. Haag: Zum chemisch-toxikologischen Nachweis von E 605 „Bayer“ sowie einiger anderer Insektizide der Thiophosphorsäureesterreihe. Arch. Pharm. **289/61**, 542 (1956).
- Schmidt, G.: Toxikologische Erfahrungen bei E 605-Vergiftungen. Arch. Toxikol. **15**, 361 (1955).
- Winterlin, W., G. Walker and H. Frank: Detection of cholinesterase-inhibiting pesticides following separation on thin-layer chromatograms. J. Agr. Food Chem. **16**, 868 (1968).

Verfasseranschrift:

Prof. Dr. Dr. **Marika Geldmacher-v. Mallinckrodt** und
Dr. **Giok-Lien Ong**, Institut für Rechtsmedizin der
Universität Erlangen-Nürnberg,
8250 Erlangen, Universitätsstraße 22

LEBENS LAUF

Geboren am 12. 10. 1935 in Djakarta-Indonesien als Tochter von T. L. Ong und seiner Frau K. N. Oei, besuchte ich dort die Volksschule und von 1949 bis 1955 das Gymnasium (S. M. P. - S. M. A. (B)). Nach dem Abitur habe ich bis 1958 Jura an der Universitas-Indonesia studiert. Im S. S. 1959 begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin an der Universität Heidelberg. Im W. S. 1961/2 setzte ich das zahnmedizinische Studium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg fort, wo ich die zahnärztliche Vorprüfung im November 1965 ablegte. Anschließend absolvierte ich den klinischen Studienabschnitt und bestand am 28. 2. 1969 das zahnmedizinische Staatsexamen. Seitdem arbeite ich an meiner Promotions-Arbeit im Institut für gerichtliche Medizin und Kriminalistik der Universität Erlangen-Nürnberg.

